

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

21. 9. 2004

REC'D 11 NOV 2004

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 9月 9日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-316719
[ST. 10/C]: [JP2003-316719]

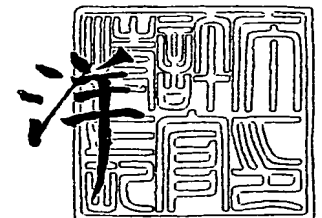
出 願 人
Applicant(s): 株式会社ツーセル
栗原 英見

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年10月28日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2004-3097344

【書類名】 特許願
【整理番号】 031578
【提出日】 平成15年 9月 9日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K
【発明者】
 【住所又は居所】 広島県広島市西区己斐東2-27-31
 【氏名】 栗原 英見
【発明者】
 【住所又は居所】 広島県広島市南区出汐1-17-9
 【氏名】 河口 浩之
【発明者】
 【住所又は居所】 広島県広島市南区段原南1-25-8-205
 【氏名】 武田 克浩
【発明者】
 【住所又は居所】 広島県広島市中区東白島町18-15-602
 【氏名】 柴 秀樹
【発明者】
 【住所又は居所】 広島県広島市中区平野町12-9-302
 【氏名】 水野 智仁
【発明者】
 【住所又は居所】 広島県広島市西区己斐本町2-11-28-703
 【氏名】 吉野 宏
【発明者】
 【住所又は居所】 広島県広島市南区宇品神田5-25-10-1001
 【氏名】 長谷川 直彦
【発明者】
 【住所又は居所】 広島県福山市伊勢丘2-1-1-1304
 【氏名】 篠原 弘明
【特許出願人】
 【住所又は居所】 広島県広島市南区段原四丁目5-17-501
 【氏名又は名称】 株式会社ツーセル
【特許出願人】
 【住所又は居所】 広島県広島市西区己斐東二丁目27-31
 【氏名又は名称】 栗原 英見
【代理人】
 【識別番号】 100089705
 【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区
 ユアサハラ法律特許事務所
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 社本 一夫
 【電話番号】 03-3270-6641
 【ファクシミリ番号】 03-3246-0233
【選任した代理人】
 【識別番号】 100076691
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 増井 忠次

【選任した代理人】
【識別番号】 100075270
【弁理士】
【氏名又は名称】 小林 泰
【選任した代理人】
【識別番号】 100080137
【弁理士】
【氏名又は名称】 千葉 昭男
【選任した代理人】
【識別番号】 100096013
【弁理士】
【氏名又は名称】 富田 博行
【選任した代理人】
【識別番号】 100111420
【弁理士】
【氏名又は名称】 金本 恵子
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 051806
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

神経栄養因子を有効成分とする、歯周病の治療剤。

【請求項 2】

歯周組織を再生させることを特徴とする、請求項 1 記載の治療剤。

【請求項 3】

セメント質を再生させることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の治療剤。

【請求項 4】

歯周靱帯を再生させることを特徴とする、請求項 1 ～ 3 の何れか 1 項に記載の治療剤。

【請求項 5】

歯槽骨を再生させることを特徴とする、請求項 1 ～ 4 の何れか 1 項に記載の治療剤。

【請求項 6】

歯肉上皮の歯根面根尖方向への進入を防止することを特徴とする、請求項 1 ～ 5 の何れか 1 項に記載の治療剤。

【請求項 7】

神経栄養因子が、脳由来神経栄養因子、神経成長因子、ニューロトロフィン 3、またはニューロトロフィン 4/5 である、請求項 1 ～ 6 の何れか 1 項に記載の治療剤。

【請求項 8】

神経栄養因子を含有する歯周組織再生用移植材。

【請求項 9】

セメント質を再生するために使用する、請求項 8 に記載の歯周組織再生用移植材。

【請求項 10】

歯周靱帯を再生するために使用する、請求項 8 または 9 に記載の歯周組織再生用移植材。

【請求項 11】

歯槽骨を再生するために使用する、請求項 8 ～ 10 の何れか 1 項に記載の歯周組織再生用移植材。

【請求項 12】

歯肉上皮の歯根面根尖方向への進入を防止するために使用する、請求項 8 ～ 11 の何れか 1 項に記載の歯周組織再生用移植材。

【請求項 13】

神経栄養因子が、脳由来神経栄養因子、神経成長因子、ニューロトロフィン 3、またはニューロトロフィン 4/5 である、請求項 8 ～ 12 の何れか 1 項に記載の治療剤。

【請求項 14】

神経栄養因子を使用する歯周組織の再生方法。

【請求項 15】

セメント質を再生させることを特徴とする、請求項 14 に記載の再生方法。

【請求項 16】

歯周靱帯を再生させることを特徴とする、請求項 14 または 15 に記載の再生方法。

【請求項 17】

歯槽骨を再生させることを特徴とする、請求項 14 ～ 16 の何れか 1 項に記載の再生方法。

【請求項 18】

歯肉上皮の歯根面根尖方向への進入を防止することを特徴とする、請求項 14 ～ 17 の何れか 1 項に記載の再生方法。

【請求項 19】

神経栄養因子が脳由来神経栄養因子、神経成長因子、ニューロトロフィン 3、またはニューロトロフィン 4/5 である請求項 14 ～ 18 の何れか 1 項に記載の再生方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】歯周病の治療剤と治療方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、歯周病の治療剤と治療方法、歯周組織再生用移植材、歯周組織の再生方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

歯肉、歯槽骨、歯周靱帯(歯根膜)、セメント質等で構成される歯周組織は、歯牙を植立させ、咀嚼や咬合等の機能を維持させるための重要な組織であり、その損傷や破壊は歯の喪失につながる。例えば、日本国内に約3000万人の患者が存在するといわれる歯周病においては、病気の進行と共に歯周組織の損傷や破壊が進み、歯を喪失する大きな原因となっている。損傷あるいは破壊された歯周組織の治療には、医薬品投与や外科手術等、様々な方法が試みられているが、いずれの薬剤や治療方法も、損傷あるいは破壊された歯周組織を再生させる効果は十分とはいえない。

【0003】

脳由来神経栄養因子(Brain-derived neurotrophic factor、BDNF)、神経成長因子(Nerve growth factor、NGF)、ニューロトロフィン3(Neurotrophin 3、NT-3)、およびニューロトロフィン4/5(Neurotrophin 4/5、NT-4/5)は神経栄養因子であり、神経細胞の分化促進や生存維持、再生促進、機能維持に關与する神経栄養因子である。BDNF、NGF、NT-3には、それぞれに、TrkB(tropomyosin receptor kinase B)、TrkA、TrkCという高親和性レセプターがある。

【0004】

BDNF、NGF、NT-3は、主として脳内に存在する神経栄養因子であり、BDNFとNGFは運動神経障害モデル、パーキンソン病モデル、アルツハイマー病モデルなど、各種の疾患モデル動物を用いた実験で、有効性が証明されている。中でも、BDNFは、運動・末梢神経疾患として筋萎縮性側索硬化症(ALS)、糖尿病や化学療法剤による末梢神経障害など、また中枢神経系疾患としてアルツハイマー病、パーキンソン病、網膜関連疾患などの治療薬としての開発が期待されている。

【0005】

これらの神経栄養因子は、中枢神経系のみならず末梢神経系においても重要な役割を果たしていると言われている。マウス肋骨の骨折治癒過程においてBDNF、NGF、NT-3、TrkC、TrkAの発現が増加した(K. Asaumiら、Bone Vol 26, No.6, 625-633, 2000)、BDNF、NGF、NT-3がマウス歯周靱帯細胞の増殖を促進した(Y. Tsuboiら、J Dent Res 80, (3), 881-886, 2001)等の報告もある。しかし、歯周組織におけるこれらの神経栄養因子の働きについての詳しい報告はない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は、歯周病治療剤と治療方法、歯周組織再生用移植材、歯周組織の再生方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究した結果、神経栄養因子が、ヒト歯周靱帯由来線維芽細胞の増殖を促進し、骨関連タンパク質のmRNA発現を促進すること、イヌの根分岐部病変モデルにおいて歯周組織の再生を促進することを知得し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明によれば、神経栄養因子を有効成分とする、歯周病の治療剤が提供される。

本発明の治療剤が、歯周組織を再生させることが好ましい。

本発明の治療剤が、セメント質、歯周靱帯または歯槽骨を再生させることが好ましい。

本発明の治療剤が、歯肉上皮の歯根面根尖方向への進入を防止することが好ましい。

本発明の治療剤において、神経栄養因子が、脳由来神経栄養因子、神経成長因子、ニューロトロフィン3、またはニューロトロフィン4/5であることが好ましい。

【0009】

本発明の別の側面によれば、神経栄養因子を含有する歯周組織再生用移植材が提供される。

本発明の移植材が、歯周組織を再生させることが好ましい。

本発明の移植材が、セメント質、歯周靱帯または歯槽骨を再生させることが好ましい。

本発明の移植材が、歯肉上皮の歯根面根尖方向への進入を防止することが好ましい。

本発明の移植材において、神経栄養因子が、脳由来神経栄養因子、神経成長因子、ニューロトロフィン3、またはニューロトロフィン4/5であることが好ましい。

【0010】

本発明のさらに別の側面によれば、神経栄養因子を使用する歯周組織の再生方法が提供される。

本発明の再生方法が、歯周組織を再生させることが好ましい。

本発明の再生方法が、セメント質、歯周靱帯または歯槽骨を再生させることが好ましい。

本発明の再生方法が、歯肉上皮の歯根面根尖方向への進入を防止することが好ましい。

本発明の再生方法において、神経栄養因子が、脳由来神経栄養因子、神経成長因子ニューロトロフィン3、またはニューロトロフィン4/5であることが好ましい。

【0011】

本発明の別の側面によれば、歯周病の治療方法であって、そうした状態に罹患しているまたは罹患しやすい対象に治療有効量の神経栄養因子を投与することを含む、歯周病の治療法が提供される。

本発明の治療法が、歯周組織を再生させることが好ましい。

本発明の治療法が、セメント質、歯周靱帯または歯槽骨を再生させることが好ましい。

本発明の治療法が、歯肉上皮の歯根面根尖方向への進入を防止することが好ましい。

本発明の治療法において、神経栄養因子が、脳由来神経栄養因子、神経成長因子、ニューロトロフィン3、またはニューロトロフィン4/5であることが好ましい。

【0012】

本発明のさらに別の側面によれば、歯周病の治療に使用する薬剤を製造するための神経栄養因子の使用が提供される。

この薬剤が、歯周組織を再生させることが好ましく、セメント質、歯周靱帯または歯槽骨を再生させることが好ましい。この薬剤が、歯肉上皮の歯根面根尖方向への進入を防止することが好ましい。神経栄養因子が、脳由来神経栄養因子、神経成長因子、ニューロトロフィン3、またはニューロトロフィン4/5であることが好ましい。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

以下、本発明のより具体的な態様、並びに本発明を実施するための方法につき説明する。

本明細書において「歯周組織」とは、歯肉、歯槽骨、歯周靱帯(歯根膜)、セメント質で構成される組織を意味する。

【0014】

「歯肉」とは、歯頸部と歯槽骨の一部を被覆している軟組織で、歯肉上皮と歯肉固有層とからなる。

「歯周靱帯」とは、歯槽骨とセメント質の間に介在している結合組織のことであり、歯根膜とも呼ばれる。

【0015】

「歯槽骨」は、歯根を取り巻いている歯槽壁の緻密質の部分に相当する固有歯槽骨と、さらにその外側に位置する海綿質と緻密質の部分からなる支持歯槽骨とに区分される。

「セメント質」は、セメント細胞を有する有細胞セメント質とセメント細胞を有さない無細胞性セメント質とに区分される。

【0016】

「再生 (regeneration)」とは、喪失組織、破壊された組織や損傷組織の再構成 (reconstruction) および再構築 (reproduction) のことであり、「歯周組織の再生」とは、歯周組織を元の状態に回復させ機能させることである。

【0017】

「修復 (repair)」とは、創傷部の構造と機能がいまだ完全な状態では回復していない組織の治癒のことであり、「歯周組織の修復」には、歯根表面への上皮性付着などが含まれる。

【0018】

「歯肉上皮の歯根面根尖方向への進入を防止する」とは、歯肉上皮細胞が露出歯根面に沿って根尖側に向かって増殖していくことを防ぐことを意味する。

「歯周組織再生用移植材」とは、歯周組織の再生を促す材料のことである。BDNFを所定の生体部位 (歯槽骨の欠損部位など) に一定の濃度で作用させるためには、何らかの足場 (scaffold) が必要である。こうした足場となる材料とBDNFを組合わせたものが本願の移植材である。

【0019】

「歯周病」とは、局所の細菌等を原因として起こる歯周組織の炎症性疾患を意味する。

本発明は、ヒトなどの温血動物において、特に好ましくはヒトに適用される。

本発明に使用する神経栄養因子、BDNF、NGF、NT-3、NT-4/5等は、遺伝子組換えや化学合成などで人工的に製造したものでも天然型 (native) でもよい。

【0020】

本発明の治療剤は、外用剤などによる局所投与が好ましい。シリンジ等に充填し、歯周ポケット内に注入してもよい。また、歯周外科治療の際に、歯周組織の欠損部に投与することも可能である。その場合には、長時間一定の濃度で作用させるために、本発明の治療剤をシートやスポンジなどに吸収させて使用することも好ましい。感染した歯周組織を除去してから投与することが好ましい。本発明の治療剤は注射により局所投与することも可能である。例えば、歯周ポケット部の歯肉に注射してもよいし、歯槽骨頂付近の歯根膜腔に注射してもよい。

【0021】

剤型としては、通常の製剤方法により、製剤的に許容しうる担体または希釈剤などを使用して製造されるクリーム剤、軟膏剤、ローション剤等の外用剤の他、例えば水系の溶剤を主成分とした注射剤などが挙げられる。粉末状の剤型として、使用直前に精製水などの溶解液に溶解して使用することも可能である。

【0022】

本発明の治療剤の投与量は、投与対象の年齢、性別、症状等により異なるが、局所投与においては、通常1歯あたり、神経栄養因子として 1×10^{-12} g \sim 1×10^{-5} g、特に 1×10^{-11} g \sim 1×10^{-7} g、さらに特に 1×10^{-10} g \sim 1×10^{-8} gであることが好ましい。一般に、注射で局所投与する場合は外用薬よりも少ない投与量でよい。

【0023】

本発明の移植材は、1つの分岐部欠損に使用する量あたり、 1×10^{-12} g \sim 1×10^{-7} g、特に 1×10^{-11} g \sim 1×10^{-8} g、さらに特に 1×10^{-10} g \sim 1×10^{-9} gの神経栄養因子を含むことが好ましい。

【0024】

本発明の治療剤や移植材は、その有効性を妨げない限り、他の薬剤と組合わせて使用してもよい。BDNF、NGF、NT-3、NT-4/5を互いに組合わせて使用してもよい。骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC)、歯周靱帯由来線維芽細胞、歯肉線維芽細胞、血管内皮細胞等と組み合

わせて使用してもよい。

【0025】

本発明の移植材において神経栄養因子と組合わせる材料としては、神経栄養因子を投与局所に維持できる生体為害性のない材料であればよいが、例えば、多孔性のシートやスポンジなどが好ましい。生体分解性タンパク材料（コラーゲン、ゼラチン、アルブミン、プレートレット・リッチ・プラズマ（PRP））や組織吸収性材料（ポリグリコール酸（PGA）、ポリ乳酸（PLA）、乳酸グリコール酸共重合体（PGLA）、ヒアルロン酸（HA）、三リン酸カルシウム（TPC））であれば、後に摘出する必要がないためさらに好ましい。例えば、テルプラグ（商品名）（テルモ）、ジーシーメンブレン（商品名）（ジーシー）、オスフェリオン（商品名）（オリンパス光学工業）等がある。

【実施例】

【0026】

以下の実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

（実施例 1）

ヒト歯周靱帯由来線維芽細胞（human periodontal ligament cell、HPL 細胞）およびヒト歯肉上皮細胞（human gingival keratinocyte、HGK）に及ぼすBDNFの影響を検討した。

【0027】

（1）使用細胞

（i）ヒト歯周靱帯由来線維芽細胞（HPL 細胞）

矯正治療のために便宜的に抜歯された健全なヒト小白歯の歯周靱帯から、HPL 細胞を分離した。歯周靱帯周囲の他の結合組織からの細胞の混入を防ぐため、抜去ヒト小白歯の歯頸部、根尖部を除く歯根中央部の健康な歯周靱帯を、メスを用いて剥離し、細切した。細切した組織を、直径60mmの細胞培養用シャーレ（CORNING、NY）に貼り付け、37℃、5% CO₂気相条件で培養した。培地は、10%FBS（GIBCO、Buffalo、NY）、ペニシリン（100ユニット/ml）（明治製菓、東京）、ストレプトマイシン（100μg/ml）（明治製菓）、およびアンホテリシン B（1μg/ml）（GIBCO）を添加したダルベッコ変法イーグル培地（DMEM、日水製薬、東京）を使用した（ここで使用した培地を「培地 A」と記す）。4～8代継代したHPL 細胞を以下の実験に供した。

【0028】

（ii）ヒト歯肉上皮細胞（HGK）

ヒト培養細胞を用いた実験の必要性および歯肉の使用目的などを患者に十分説明し、患者の同意を得た後に、歯肉の提供を受けた。智歯周囲炎の患者から、原因となった智歯を抜歯する際に、余剰の歯肉弁から歯肉片を獲得した。得られた歯肉片を、4℃で一昼夜、0.01%エチレンジアミン 4 酢酸（EDTA）と0.025%トリプシンを含むダルベッコPBS（-）（PBS（-）、日水製薬）で処理して、HGKを分離した。ウシインシュリン（10μg/ml）（Sigma、St. Louis, MO, USA）、ヒトトランスフェリン（5μg/ml）（Sigma）、2-メルカプトエタノール（10μM）、2-アミノエタノール（10μM）、亜セレン酸ナトリウム（10μM）、牛下垂体抽出液（50μg/ml）、ペニシリン（100ユニット/ml）、ストレプトマイシン（100μg/ml）およびアンホテリシン B（50ng/ml）を含むMCDB153培地（Sigma）で初代培養を行った（ここで使用した培地を「培地 C」と記す）。培養は、ウシ I 型コラーゲンがコートされた直径60mmのシャーレ（SUMILON セルタイトC-1、住友ベークライト、東京）を用いて、37℃、5% CO₂気相条件で行った。3～4代継代したHGKを以下の実験に供した。

【0029】

（2）HPL細胞におけるBDNFとそのレセプターの発現

HPL細胞およびヒト歯周靱帯におけるBDNFとTrkBのmRNA発現を、1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR（Roche、Indianapolis）を使用して、逆転写PCR法で調べた。

【0030】

上記（1）（i）で得られたHPL 細胞がコンフルエントになった時点で細胞を回収し、ISOGEN（ニッポンジーン、東京）にて細胞を溶解させた後、クロロホルムを加えて遠心分離

し、得られた水相にイソプロパノールを加えて総RNAを抽出した。

【0031】

上記(1)(i)で得られたヒト歯周靱帯をISOGEN中でホモジナイズした後、クロロホルムを加えて遠心分離し、得られた水相にイソプロパノールを加えて総RNAを抽出した。

精製した総RNAのうち1 μ gの各RNAを、オリゴdTプライマーを用いて逆転写し、得られたcDNAをPCR反応30サイクルにて増幅させた後、1.5%アガロースゲルに泳動した。コントロールとしてはグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) を使用した。

【0032】

結果を図1に示す。コントロールとしてはグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) を使用した。図1から明らかなように、ヒト歯周靱帯においてBDNFとTrkBのmRNAの発現がみられ、そのヒト歯周靱帯より分離、培養したHPL細胞においても、BDNFとTrkBのmRNAが発現していることが確認された。

【0033】

(3) 細胞のBDNFでの処理

(i) HPL細胞

上記(1)(i)で得られたHPL細胞を、ウシI型コラーゲンがコートされた直径60mmのシャーレ (SUMILON セルタイトC-1) に、1シャーレあたり 3.5×10^5 個で、50 μ g/mlのL-アスコルビン酸を含む培地Aを用いて、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂気相条件で13日間培養した (ここで使用した培地を「培地B」と記す)。培地は2日に1回交換した。14日目の培養終了前0、3、6、12または24時間において、細胞をDMEMで2回洗浄し、最終濃度0、1、10、50または100ng/mlのBDNF (Recombinant Human BDNF, R & D system, Minneapolis, USA) を含む無血清培地 (ペニシリン (100ユニット/ml)、ストレプトマイシン (100 μ g/ml)、アンホテリシンB (1 μ g/ml) (GIBCO)、およびL-アスコルビン酸 (50 μ g/ml) を添加したDMEM) (ここで使用した培地を「培地D」と記す) に交換した。

【0034】

(ii) HGK

上記(1)(ii)で得られたHGKを、ウシI型コラーゲンがコートされた96穴プレート (SUMILON セルタイトC-1プレート96F、住友ベークライト) に、 2×10^3 個/ウェルで接種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂気相条件で、培地Cを用いて培養した。培地は2日に1回交換した。細胞増殖期にあたる培養4～5日目に、プレートの細胞をMCDB153培地で2回洗浄し、最終濃度0、1、10、25、50または100ng/mlのBDNFを含む培地 (牛下垂体抽出液を含まないこと以外に培地Cと同一の組成の培地) に交換し、24時間培養した。

【0035】

(4) HPL細胞における骨関連タンパク質の発現

(i) mRNAの発現

上記(3)(i)に記載の方法と同様にして、最終濃度0、1、10、50または100ng/mlのBDNFで処理したHPL細胞から、ISOGENを用いて総RNAを抽出し、精製した。アルカリホスファターゼ (ALPase)、骨形成タンパク-2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2)、骨形成タンパク-4 (bone morphogenetic protein-4, BMP-4)、オステオポンチン (osteopontin, OPN)、オステオプロテジェリン (osteoprotegerin, OPG) のmRNA発現量は、ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems、東京)を用いて、PCRプロダクトの生成過程をリアルタイムでモニタリングし、定量的に解析した (Real-time PCR法)。コントロールとしてはGAPDHを使用した。

【0036】

各骨関連タンパク質のmRNA発現に対する、BDNFの経時効果測定の結果を図2、3に、濃度効果測定の結果を図4に示す。各グラフにおいて、*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を表す (統計学的検定はt-testによる)。

【0037】

図2、3、4から明らかなように、BDNFはOPG、BMP-4のmRNA発現に影響を及ぼさなかったが、ALPase、BMP-2、OPNのmRNA発現量を濃度および時間依存的に増加させた。

【0038】

(ii) タンパク質の発現

上記(1)(i)で得られたHPL細胞を、ウシI型コラーゲンがコートされた48穴プレート(SUMILON セルタイトC-1プレート 48F、住友ベークライト)に、 1×10^4 個/ウェルで播種し、培地Bを用いて13日間培養した。培地は2日に1回交換した。14日目の培養終了24時間前に、プレートの細胞をDMEMで2回洗浄し、最終濃度0、1、10、25、50または100ng/mlのBDNFを含む無血清培地Dに交換した。培養終了後に、上清を回収し、上清中の分泌OPN量、分泌BMP-2量を、ELISA法で測定した。分泌OPN量の測定にはサンドイッチELISAキット(ABL、群馬)を、分泌BMP-2量の測定にはサンドイッチELISAキット(R & D system)を使用した。

【0039】

図5に、HPL細胞の分泌OPN量と分泌BMP-2量に対する、BDNFの経時効果測定および濃度効果測定の結果を示す。各グラフにおいて、*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を表す(統計学的検定はt-testによる)。図5から明らかなように、BDNFは、HPL細胞におけるOPNとBMP-2の分泌を促進した。

【0040】

(5) HPL細胞とHGKの増殖

HPL細胞とHGKのDNA合成能に及ぼすBDNFの影響を、Cell Proliferation ELISA system, version 2(アマシャムファルマシアバイオテック)を用いて、ELISA法で測定した。

【0041】

上記(1)(i)で得られたHPL細胞を、ウシI型コラーゲンがコートされた96穴プレート(SUMILON セルタイトC-1プレート96F)に、 5×10^3 個/ウェルで播種し、培地Bを用いて10日間培養した。細胞をDMEMで2回洗浄し、10%FBSの代わりに0.3%FBSを添加した培地Bで24時間培養した後、同じ培地にBDNFを最終濃度0、1、10、25、50又は100ng/mlとなるように添加して調製した培地と交換し、さらに24時間培養した。培養終了の2時間前(つまりにBDNF添加の22時間後)に、プロモデオキシウリジン(BrdU)を10ng/mlの濃度で各ウェルに添加して、細胞に取り込ませた。培養は37℃、5%CO₂気相条件下で行った。

【0042】

上記(1)(ii)で得られたHGKを、上記(3)(ii)と同一の方法で培養し、BDNFで処理した。培養終了の2時間前(つまりにBDNF添加の22時間後)に、プロモデオキシウリジン(BrdU)を10ng/mlの濃度で各ウェルに添加して、細胞に取り込ませた。

【0043】

培養終了後、HPL細胞とHGKを固定した後、ブロッキングを行い、ペルオキシダーゼ標識抗BrdU抗体を室温で2時間作用させ、TMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)基質を加え、波長450nmにおける吸光度を吸光度計(MICRO PLATE READER、TOSOH)で測定した。コントロールとして、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)を最終濃度0、0.3、1、3、5、10ng/mlで24時間作用させた細胞を同様に処理して、DNA合成能を測定した。

【0044】

結果を図6に示す。(A)はHPL細胞に対する効果を示すグラフであり、(B)はHGKに対する効果を示すグラフである。なお、各グラフにおいて、*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を表す(統計学的検定はt-testによる)。

【0045】

図6から明らかなように、BDNFはHPL細胞のDNA合成能を促進させたのに対し、HGKのDNA合成能には影響を及ぼさなかった。

【0046】

(6) HPL細胞のコラーゲン合成

上記(1)(i)で得られたHPL細胞をウシI型コラーゲンをコートした48穴プレートに播種し、培地Bを用いて13日間培養した。培地は2日に1回交換した。14日目の培養終了前0、3、6、12または24時間、プレートの細胞をDMEMで2回洗浄し、最終濃度0、1、10、25、50または100ng/mlのBDNFを含む無血清培地Dに交換した。

【0047】

Procollagen type I C-peptide (PIP)EIA kit (TAKARA) を使用して、ELISA法でHPL細胞のコラーゲン合成量を測定した。I型プロコラーゲンC末端プロペプチド (PIP) に特異的なモノクローナル抗体 (ペルオキシダーゼ標識) を用いて、HPL細胞培養上清中のコラーゲン合成量を、波長450nmにおける吸光度を吸光度計 (MICRO PLATE READER) で測定した。

【0048】

結果を図7に示す。(A)はBDNFのI型コラーゲン合成への濃度効果測定の結果を示し、(B)は経時効果測定の結果を示す。図7から明らかなように、BDNFはHPL細胞のI型コラーゲン合成量を増加させた。

【0049】

(実施例2)

ビーグル犬の3級根分岐部病変モデルにおけるBDNFの効果を検討した。

直径8mm×5mmのテルプラグ (商品名) (テルモ) に、濃度5、25、50 μ g/mlのBDNF溶液 (滅菌生理食塩液中) の25 μ lをしみこませ、移植材とした。

【0050】

7頭の雌ビーグル犬 (12~20ヵ月齢、体重10~14kg) を、ドミトール (明治製菓) 筋注による鎮静下に、全顎的にハンドスケーラーでスケリングを行った。以後2日に1回の割合でブラッシングとポビドンヨードを有効成分とする含嗽薬であるイソジン (商品名) (明治製菓) による口腔清掃とを1ヵ月行い、臨床的に健康な歯周組織の状態を確立した。

【0051】

これらのビーグル犬に、ペントバルビタール系麻酔剤の静脈内注射により、全身麻酔を施し、左右両側下顎側歯肉に浸潤麻酔を行い、第一小白歯遠心から第一大臼歯近心にかけての歯肉溝切開を行い、歯肉を剥離し粘膜骨膜弁を形成した。次いで、左右両側第二、第三、第四小白歯の分岐部歯槽骨をラウンドバーと骨ノミで削除し、分岐部3級 (Lindhe & Nymanの分類による) の骨欠損を作成した。骨欠損の大きさは、未処置の分岐部直下から約4mm根尖側寄りまでとした。

【0052】

露出させた歯根面の残存セメント質をハンドスケーラーで除去した後、分岐部骨欠損内を生理食塩液で十分洗浄して削片を洗い流し、1ヵ所あたり直径8mm×5mmのテルプラグ移植材を填塞した。BDNFを含まない、滅菌生理食塩液25 μ lのみをしみこませた直径8mm×5mmのテルプラグ移植材を填塞して、コントロールとした。

【0053】

手術6週間後に、ペントバルビタール系麻酔剤の静脈内注射による全身麻酔下で、4%パラホルムアルデヒドで全身を灌流固定した。灌流固定後、下顎を切断し、処理した歯及び歯周組織を一塊として摘出した。得られた標本を、4%パラホルムアルデヒドで1日浸漬固定後、10%EDTAにて脱灰を行い、通法に従いアルコール脱水しパラフィンに包埋した。この標本から、近遠心方向に歯軸と平行な切片 (厚さ約5 μ m) を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。

【0054】

作成した組織標本のなかで、近遠心方向歯軸に平行でしかも根中央付近で薄切された標本を選択し、光学顕微鏡 (ECLIPSE E600、NIKON) で組織観察と計測を行った。骨再生率は、裸出させた根分岐部欠損の面積に対する再生歯槽骨の面積の割合 (百分率) として表した。セメント質再生率は、裸出させた歯根面の長さに対する、再生セメント質の長さの割合 (百分率) として表した。

【0055】

結果を図8、9、10に示す。図8 (A) はセメント質再生へのBDNFの効果の測定結果を示し、図8 (B) は歯槽骨再生へのBDNFの効果の測定結果を示す。図9 (A) はBDNF非投与 (コントロール) の根分岐部骨欠損部のヘマトキシリン・エオジン染色標本であり、

図9 (B) は、BDNFを投与した (BDNF (5 μ g/ml) を含む移植材を填塞) 根分岐部骨欠損部の光学顕微鏡像である (倍率20倍)。図10は図9 (B) の根分岐部直下の部分拡大像である (倍率200倍)。

【0056】

図8から明らかなように、BDNFの投与により、イヌの3級根分岐部病変モデルにおいて、セメント質の再生と歯槽骨の再生が認められた。

図9 (A) のコントロール標本においては、セメント質、歯槽骨、歯周靱帯の再生がいくらか観察されたものの、骨欠損底部から歯冠側方向のほぼ1/2に留まっていた。根分岐部直下の欠損部にはセメント質再生、歯槽骨再生は認められず、上皮の進入も認められ、線維芽細胞、コラーゲン線維、血管を主体とした結合組織で埋めつくされていた。

【0057】

図9 (B) および図10のBDNFを投与した根分岐部骨欠損部の標本では、裸出させた歯根面のほとんどの部分でセメント質が再生しており、上皮の進入も見られなかった。また、再生セメント質と再生歯槽骨の間には一定の幅を維持した歯周靱帯も観察された。

【0058】

(実施例3)

HPL細胞およびHGKに及ぼすNGFの影響を検討した。

(1) HPL細胞におけるNGFとそのレセプターの発現

上記実施例1 (2) と同一の方法でHPL細胞から総RNAを回収し、精製した。得られた総RNAを試料として、NGFとTrkAとのmRNA発現をノーザンブロット法で測定した。コントロールとしてはGAPDHを使用した。

【0059】

結果を図11に示す。図11 (A) はNGFのmRNA発現を示し、図11 (B) はTrkAのmRNA発現を示す。図から明らかなように、HPL細胞においてNGFのmRNAとTrkAのmRNAとが発現していることが確認された。

【0060】

(2) HPL細胞における骨関連タンパク質の発現

HPL細胞の骨関連タンパク質のmRNA発現に及ぼすNGFの影響を測定した。

HPL細胞を、最終濃度0、5、10、25、50または100ng/mlのNGF (Recombinant Human NGF、R & D system、Minneapolis、USA) をBDNFの代わりに使用すること以外は、実施例1 (4) (i) と同一の方法で処理した。NGF処理したHPL細胞のALPase、BMP-2、BMP-4、OPN、OPGの各mRNA発現量を、実施例1 (4) (i) と同一の方法で測定した。

【0061】

図12、13、14に、それぞれ、OPN、ALPase、BMP-2のmRNA発現に対する、NGFの経時効果測定および濃度効果測定の結果を示す。各グラフにおいて、*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を表す。検定はt-testによる。

【0062】

図12、13、14から明らかなように、NGFは、ALPase、BMP-2、OPNのmRNA発現量を濃度および時間依存的に増加させた。しかし、NGFは、OPG、BMP-4のmRNA発現には影響を及ぼさなかった。

【0063】

(3) HPL細胞とHGKの増殖

HPL細胞とHGKのDNA合成能に及ぼすNGFの影響を測定した。

HPL細胞とHGKを、最終濃度0、5、10、25、50または100ng/mlのNGFをBDNFの代わりに使用すること以外は、実施例1 (5) と同一の方法で処理した。NGF処理したHPL細胞とHGKのDNA合成能を、実施例1 (5) と同一の方法で測定した。

【0064】

結果を図15に示す。NGF作用時間はすべて24時間である。(A) はHPL細胞に対する効果を示し、(B) はHGKに対する効果を示す。各グラフにおいて、*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を表す。検定はt-testによる。

【0065】

図15から明らかなように、NGFはHPL細胞のDNA合成能を促進させたのに対し、HGKのDNA合成能を低下させた。

【0066】

(実施例4)

HPL細胞およびHGKに及ぼすNT-3の影響を検討した。

(1) HPL細胞におけるNT-3とそのレセプターの発現

上記実施例1(2)と同一の方法でHPL細胞から総RNAを回収し、精製した。得られた総RNAを試料として、NT-3とTrkCのmRNA発現を、ノーザンブロット法で測定した。コントロールとしてはGAPDHを使用した。

【0067】

結果を図16に示す。(A)はNT-3のmRNA発現を示し、(B)はTrkCのmRNA発現を示す。図から明らかなように、HPL細胞においてNT-3のmRNAとTrkCのmRNAとが発現していることが確認された。

【0068】

(2) HPL細胞における骨関連タンパク質の発現

HPL細胞のALPase活性に及ぼすNT-3の影響を測定した。

HPL細胞を、最終濃度0、1、10または50ng/mlのNT-3(Recombinant Human NT-3、R & D system、Minneapolis、USA)をBDNFの代わりに使用すること以外は実施例1(3)(i)と同一の方法で処理し、そのALPase活性をBessey-Lowry法に従って定量した。すなわち、NT-3処理したHPL細胞をリン酸緩衝液で3回洗浄し、10mMトリス塩酸緩衝液を加えた後、氷冷下で超音波処理を行い、試料を調製した。p-ニトロフェニルリン酸を基質とするALPase測定キット(和光純業)を使用して、試料中のALPaseの活性を測定した。

【0069】

図17に、ALPase活性に対するNT-3の濃度効果測定の結果を示す。NT-3作用時間はすべて24時間である。図から明らかなように、NT-3は、ALPase活性に対してそれほど影響が見られなかった。

【0070】

(3) HPL細胞の増殖

実施例1(1)と同一の方法で分離したHPL細胞を、最終濃度0、1、5、10、50または100ng/mlのNT-3をBDNFの代わりに使用すること以外は、実施例1(5)と同一の方法で処理し、そのDNA合成能を、実施例1(5)と同一の方法で測定した。

【0071】

結果を図18に示す。NT-3作用時間はすべて24時間である。本グラフにおいて、*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を表す。検定はt-testによる。図から明らかなように、NT-3はHPL細胞のDNA合成能を促進させた。

【産業上の利用可能性】

【0072】

本発明の治療剤と治療方法、歯周組織再生用移植材、歯周組織の再生方法は、歯周病治療において有効と成り得る可能性がある。

【図面の簡単な説明】

【0073】

【図1】HPL細胞およびヒト歯周靱帯における、BDNFとTrkBとのmRNA発現を示す電気泳動図である。各電気泳動図の、左端のレーンはマーカーである。(A)は、ヒト歯周靱帯およびHPL細胞におけるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)のmRNA(613bp)の発現を示す。(B)は、ヒト歯周靱帯におけるBDNFのmRNA(438bp)とTrkBのmRNA(434bp)の発現を示す。(C)は、HPL細胞におけるBDNFとTrkBとのmRNA発現を示す。

【図2】HPL細胞における、BDNFの作用時間と、OPNのmRNA(532bp)、ALPaseのmRNA(381bp)、BMP-2のmRNA(440bp)の発現量との関係を示す電気泳動図とグラフであ

る。HPL 細胞は、すべて最終濃度50ng/mlのBDNFで処理した。各電気泳動図の左端のレーンはマーカーである。各グラフ縦軸は、BDNF作用時間0のmRNA発現量を1としたときの、各作用時間における各mRNAの発現量の割合を示す。横軸は、BDNFの作用時間を示す。各棒グラフのバーは、平均値±標準偏差の範囲を表す。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ の統計学的有意差を示す(t-test)。(A)はALPaseのmRNAの発現を示し、(B)はOPNのmRNAの発現を示し、(C)はBMP-2のmRNAの発現を示し、(D)はGAPDHのmRNAの発現を示す。

【図3】HPL 細胞における、BDNFの作用時間とOPGのmRNA(736bp)、BMP-4のmRNA(339bp)の発現量との関係を示す電気泳動図とグラフである。HPL 細胞は、すべて最終濃度50ng/mlのBDNFで処理した。各電気泳動図の左端のレーンはマーカーである。各グラフ縦軸は、BDNF作用時間0のmRNA発現量を100としたときの、各作用時間におけるmRNAの発現量の百分率を示す。横軸は、BDNFの作用時間を示す。各棒グラフのバーは、平均値±標準偏差の範囲を表す。(A)はBMP-4のmRNAの発現を示し、(B)はOPGのmRNAの発現を示す。

【図4】HPL 細胞における、BDNFの投与量とOPN、ALPase、BMP-2のmRNAの発現量との関係を示す電気泳動図とグラフである。各濃度のBDNFを、HPL 細胞に、ALPase、BMP-2は24時間、OPNは12時間作用させた。各電気泳動図の左端のレーンはマーカーである。各グラフ縦軸は、BDNF投与量0のときのmRNA発現量を1とした場合の、各投与量における各mRNAの発現量の割合を示す。横軸は、BDNFの濃度(ng/ml)を示す。各棒グラフのバーは、平均値±標準偏差の範囲を表す。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ の統計学的有意差を示す(t-test)。(A)はALPaseのmRNAの発現を示し、(B)はOPNのmRNAの発現を示し、(C)はBMP-2のmRNAの発現を示し、(D)はGAPDHのmRNAの発現を示す。

【図5】(A)は、HPL 細胞における、BDNFの投与量とOPNの分泌量との関係を示すグラフである。各濃度のBDNFを、HPL 細胞に12時間作用させた。縦軸にOPNの分泌量(ng/ml)、横軸にBDNFの濃度(ng/ml)を示す。(B)は、HPL 細胞における、BDNFの投与量とBMP-2の分泌量との関係を示すグラフである。各濃度のBDNFを、HPL 細胞に、24時間作用させた。縦軸にBMP-2の分泌量(pg/ml)、横軸にBDNFの濃度(ng/ml)を示す。(C)は、HPL 細胞における、BDNFの作用時間とBMP-2の分泌量との関係を示すグラフである。細胞は最終濃度50ng/mlのBDNFで処理した。縦軸にBMP-2の分泌量(pg/ml)、横軸にBDNFの作用時間を示す。(A)～(C)の各棒グラフのバーは、平均値±標準偏差の範囲を表す。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ の統計学的有意差を示す(t-test)。

【図6】BDNFの投与量とHPL 細胞およびHGKのDNA合成能との関係を示すグラフである。各濃度のBDNFを、HPL 細胞およびHGKに24時間作用させた。各グラフの縦軸は、BDNFあるいはbFGF非投与(つまりBDNF濃度0あるいはbFGF濃度0)のときのDNA合成能を100としたときの、各投与量におけるDNA合成能の割合を示している。横軸はBDNFまたはbFGF濃度(ng/ml)を示す。各棒グラフのバーは、平均値±標準偏差の範囲を表す。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ の統計学的有意差を示す(t-test)。(A)はHPL 細胞におけるDNA合成能を示し、(B)はHGKにおけるDNA合成能を示す。

【図7】(A)は、HPL 細胞における、BDNFの投与量とI型コラーゲンの合成量との関係を示すグラフである。各濃度のBDNFを、HPL 細胞に24時間作用させた。縦軸にI型コラーゲンの合成量(μ g/ml)、横軸にBDNFの濃度(ng/ml)を示す。(B)は、HPL 細胞における、BDNFの作用時間とI型コラーゲン合成量との関係を示すグラフである。細胞は最終濃度50ng/mlのBDNFで処理した。縦軸にI型コラーゲン合成量(μ g/ml)、横軸にBDNFの作用時間を示す。(A)、(B)の各棒グラフのバーは、平均値±標準偏差の範囲を表す。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ の統計学的有意差を示す(t-test)。

【図8】イヌの3級根分岐部病変モデルにおける、BDNFの投与量とセメント質および歯槽骨の再生との関係を示すグラフである。縦軸にセメント質再生率(%)または骨

再生率 (%) を示し、横軸にBDNFの濃度 ($\mu\text{g/ml}$) を示す。各棒グラフのバーは、平均値±標準偏差の範囲を表す。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ の統計学的有意差を示す (t-test)。(A) はセメント質再生率との関係を示し、(B) は骨再生率との関係を示す。

【図 9】実施例 2 で作成されたヘマトキシリン・エオジン染色標本の光学顕微鏡像である。(A) は、対照群のBDNFを含まないテルプラグを填塞した根分岐部骨欠損部位の顕微鏡像 (倍率20倍) であり、(B) は、BDNF ($5\mu\text{g/ml}$) を含む移植材を填塞した分岐部骨欠損部位の顕微鏡像 (倍率20倍) である。

【図 10】図 9 (B) の根分岐部直下の部分拡大像である (倍率200倍)。根分岐部直下において、裸出させた歯根面のほとんどの部分でコラーゲン線維を埋入したセメント質が再生しており、上皮の進入も見られなかった。

【図 11】HPL細胞における、NGFとTrkAとのmRNA発現量を示す放射活性のバンドとグラフである。各グラフ縦軸は、GAPDHのmRNA発現量に対する各mRNA発現量の割合を示す。各グラフ中、HGFは歯肉線維芽細胞、HPCは歯髄細胞、HSFは包皮由来線維芽細胞、HNBはヒト神経芽細胞腫細胞を示す。(A) は、NGFのmRNA発現を示し、(B) はTrkAのmRNA発現を示す。

【図 12】HPL 細胞におけるOPNのmRNA発現量に及ぼす、NGFの影響を示すグラフである。(A) はNGFの経時効果の測定結果を示すグラフであり、グラフ縦軸は、NGF作用時間 0 におけるmRNA発現量を 1 としたときの、各作用時間におけるOPNのmRNA発現量の割合を示す。グラフ横軸はNGFの作用時間を示す。すべて最終濃度 100ng/ml のNGFで処理した。(B) は濃度効果の測定結果を示すグラフである。グラフ縦軸は、NGF濃度 0 におけるmRNA発現量を 1 としたときの、各濃度におけるOPNのmRNA発現量の割合を示す。横軸はNGF濃度 (ng/ml) を示す。NGFはすべて 24 時間作用させた。

【図 13】HPL 細胞におけるALPaseのmRNA発現量に及ぼす、NGFの影響を示すグラフである。(A) はNGFの経時効果の測定結果を示すグラフであり、グラフ縦軸は、NGF作用時間 0 におけるALPaseのmRNA発現量を 1 としたときの、各作用時間におけるALPaseのmRNA発現量の割合を示す。グラフ横軸はNGFの作用時間を示す。(B) は濃度効果の測定結果を示すグラフである。グラフ縦軸は、NGF濃度 0 におけるALPaseのmRNA発現量を 1 としたときの、各濃度におけるALPaseのmRNA発現量の割合を示す。横軸はNGF濃度 (ng/ml) を示す。

【図 14】HPL 細胞におけるBMP-2のmRNA発現量に及ぼす、NGFの影響を示すグラフである。(A) はNGFの経時効果の測定結果を示すグラフであり、グラフ縦軸は、NGF作用時間 0 におけるBMP-2のmRNA発現量を 1 としたときの、各作用時間におけるBMP-2のmRNA発現量の割合を示す。グラフ横軸はNGFの作用時間を示す。(B) は濃度効果の測定結果を示すグラフである。グラフ縦軸は、NGF濃度 0 におけるBMP-2のmRNA発現量を 1 としたときの、各濃度におけるBMP-2のmRNA発現量の割合を示す。横軸はNGF濃度 (ng/ml) を示す。

【図 15】NGFの投与量とHPL 細胞およびHGKのDNA合成能との関係を示すグラフである。各濃度のNGFを、HPL 細胞およびHGKに24時間作用させた。各グラフの縦軸は、NGF濃度 0 におけるDNA合成能を 100 としたときの、NGF各投与量におけるDNA合成能の割合を示している。横軸はNGF濃度 (ng/ml) を示す。(A) はHPL 細胞におけるDNA合成能を示し、(B) はHGKにおけるDNA合成能を示す。

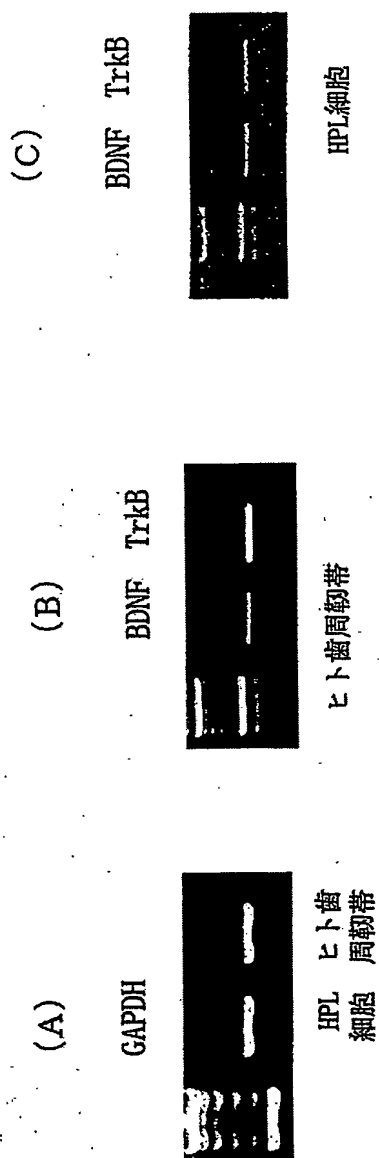
【図 16】HPL細胞における、NT-3とTrkCとのmRNA発現量を示す放射活性のバンドとグラフである。各グラフ縦軸は、GAPDHのmRNA発現量を 1 としたときの、各mRNA発現量の割合を示す。各グラフ中、HGFは歯肉線維芽細胞、HPCは歯髄細胞、HSFは包皮由来線維芽細胞、HNBはヒト神経芽細胞腫細胞を示す。(A) は、NT-3のmRNA発現を示し、(B) はTrkCのmRNA発現を示す。

【図 17】HPL細胞における、NT-3の投与量とALPase活性との関係を示すグラフである。グラフ縦軸はALPase活性 (nmol/ウェル) を示し、横軸はNT-3濃度 (ng/ml) を示す。

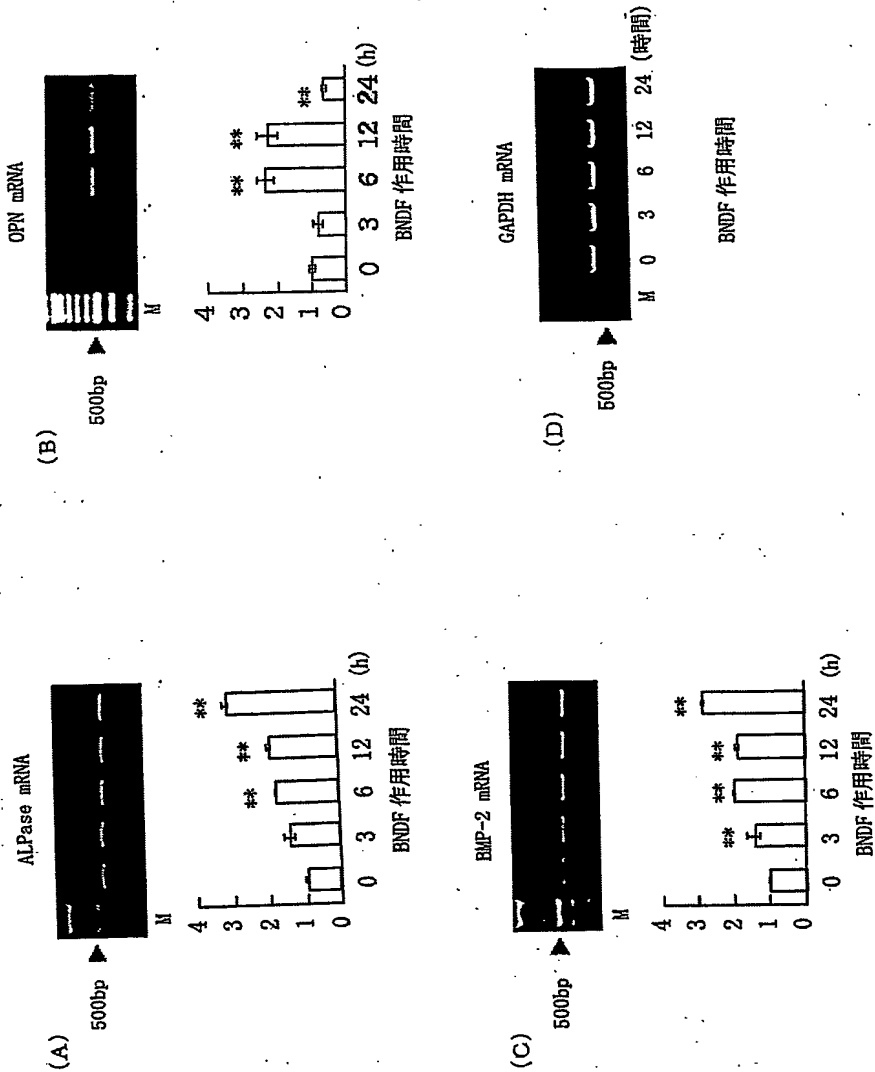
【図 1 8】 HPL 細胞における、NT-3の投与量とHPL細胞のDNA合成能との関係を示すグラフである。グラフの縦軸は、NT-3各濃度におけるHPL細胞のDNA合成能を吸光度で比較したものである。横軸はNT-3濃度 (ng/ml) を示す。

【書類名】 図面

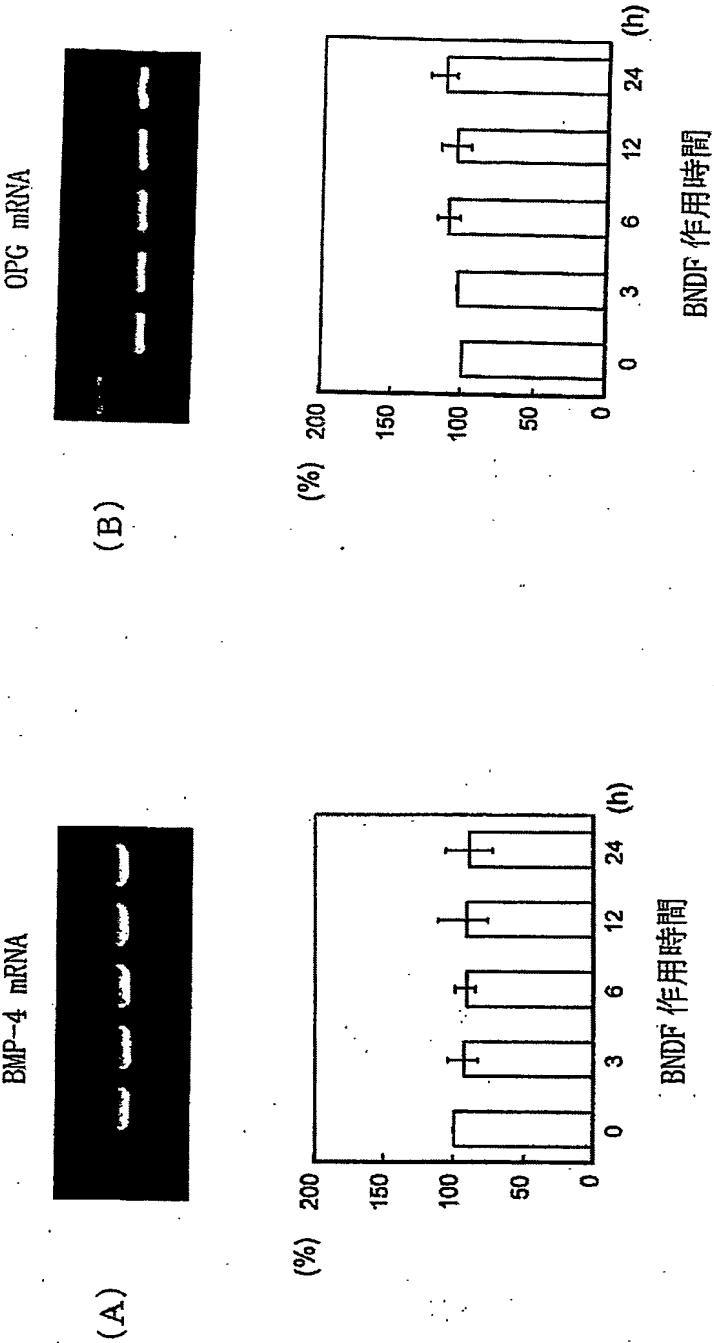
【図 1】



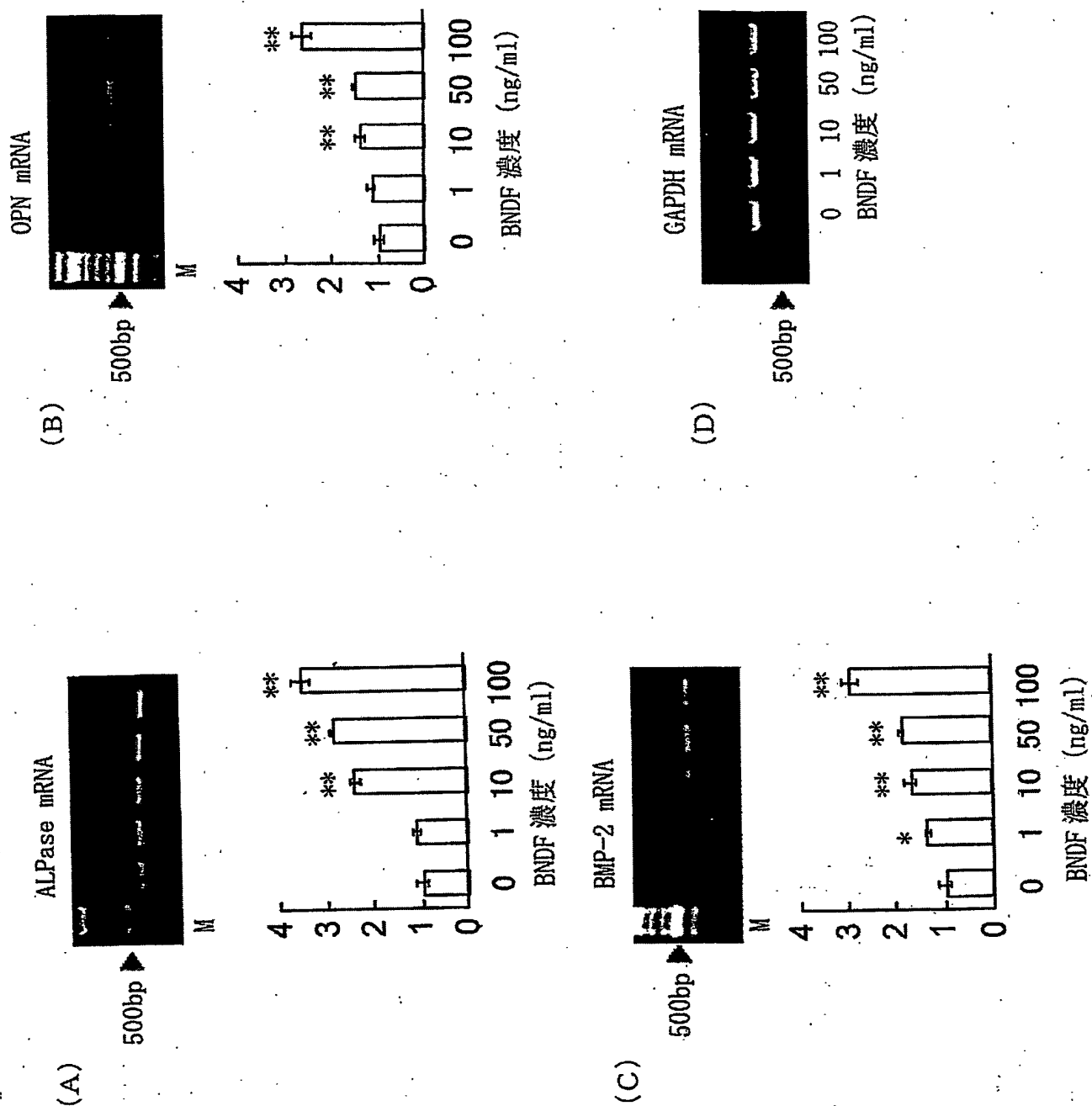
【図 2】



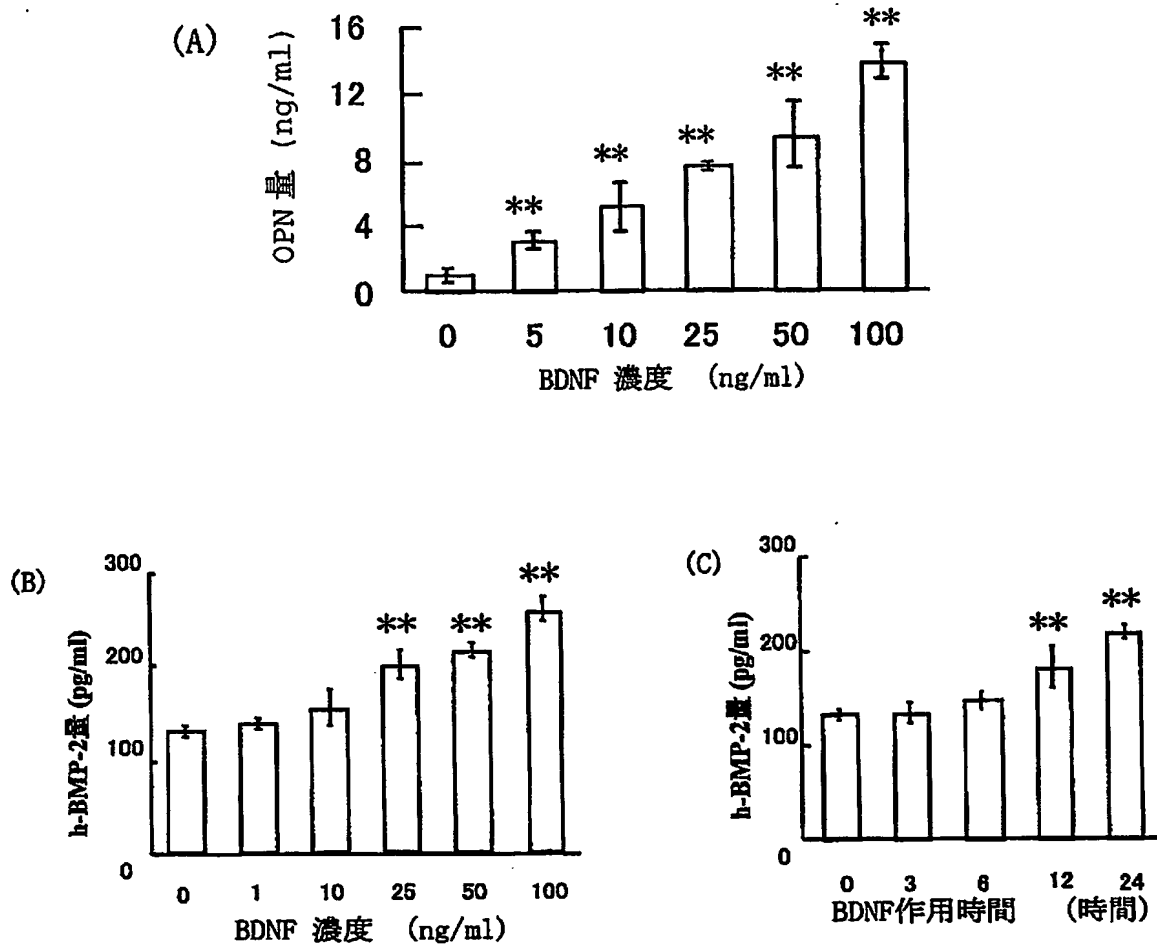
【図 3】



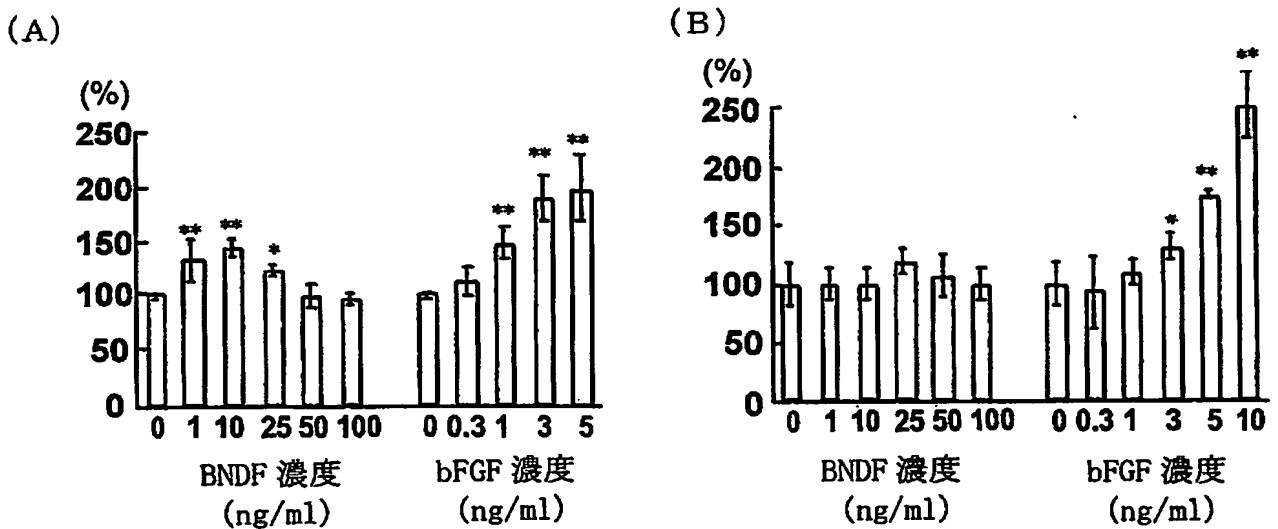
【図4】



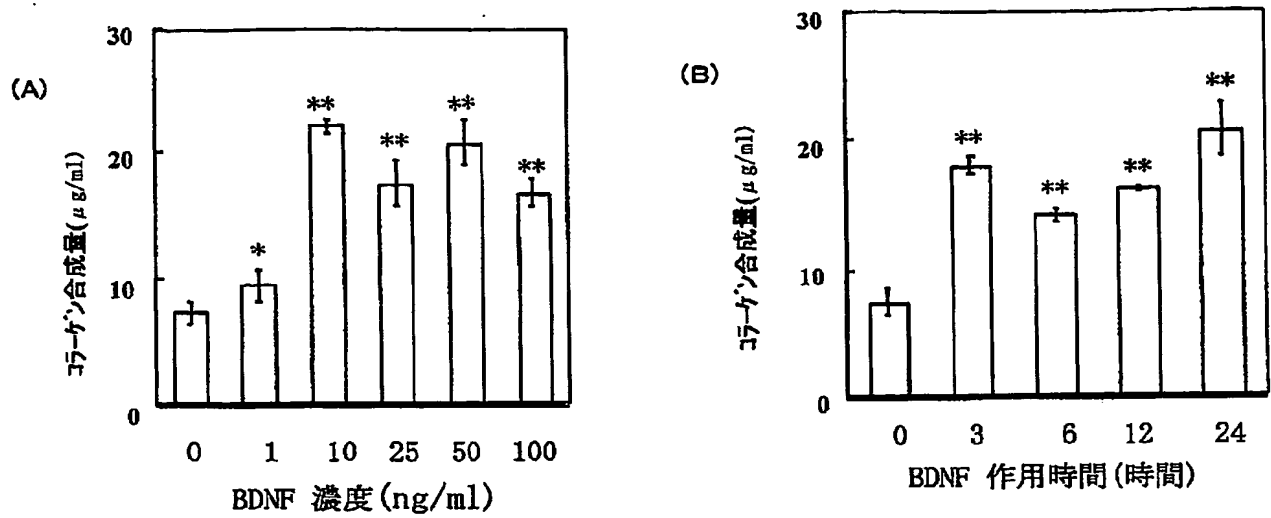
【図 5】



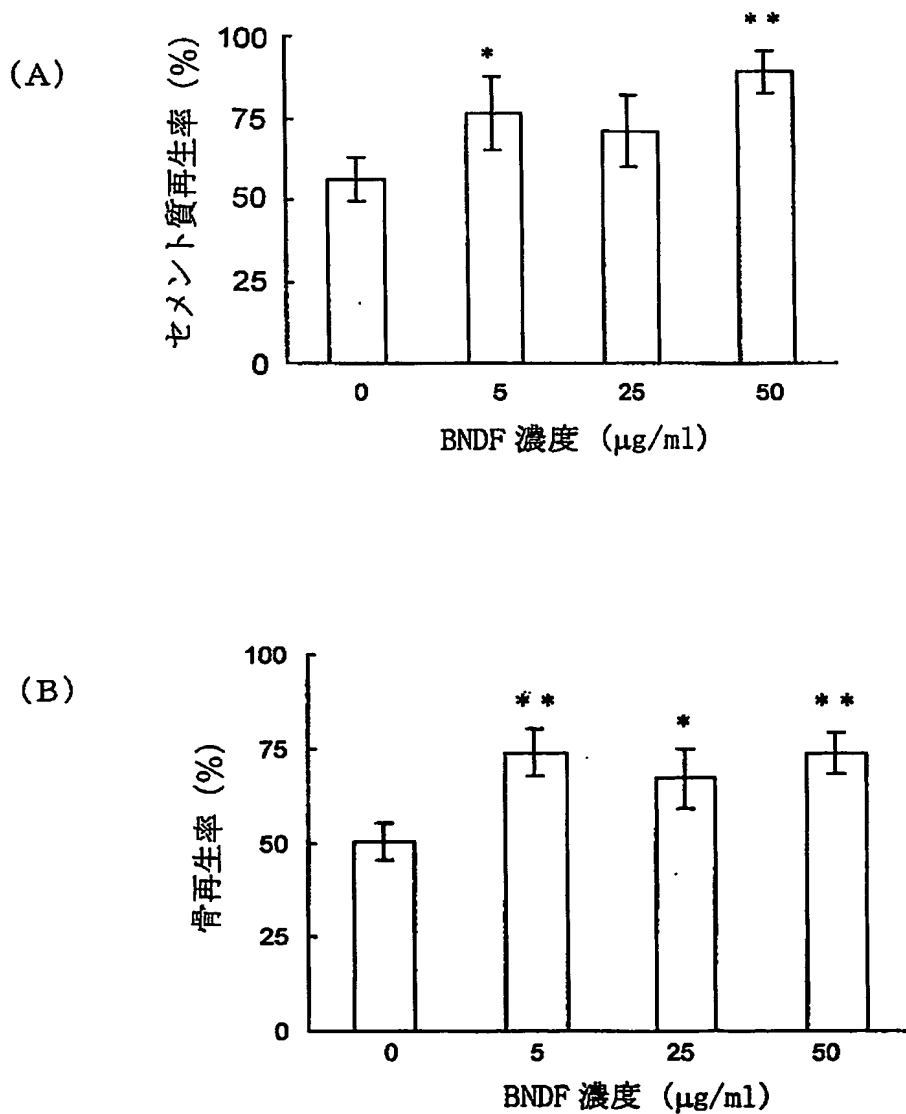
【図 6】



【図 7】



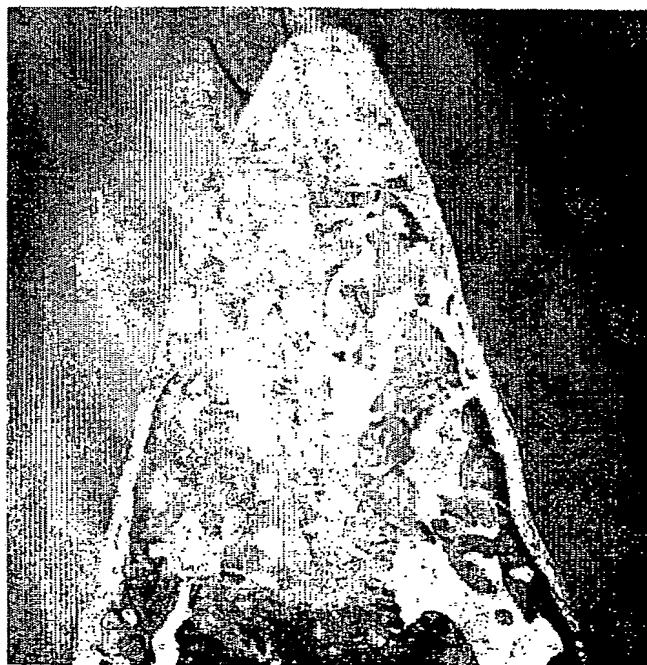
【図 8】



【図 9】

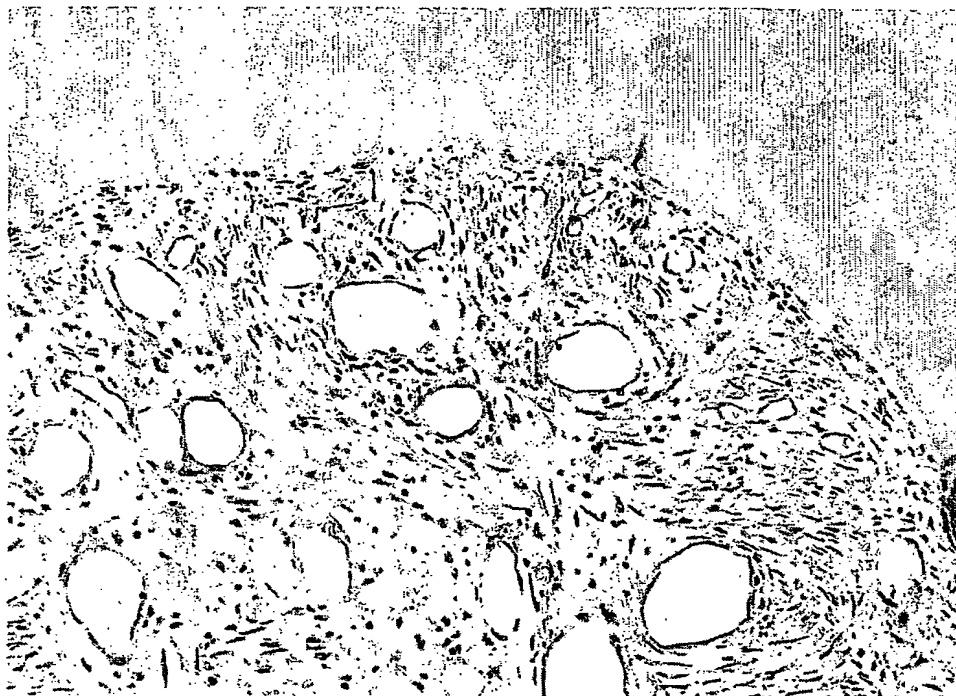


(A)



(B)

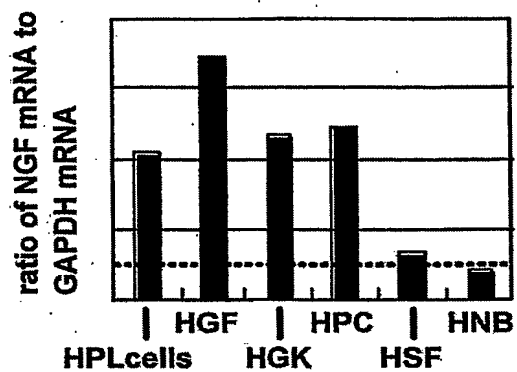
【図 10】



【図 11】

(A) NGF

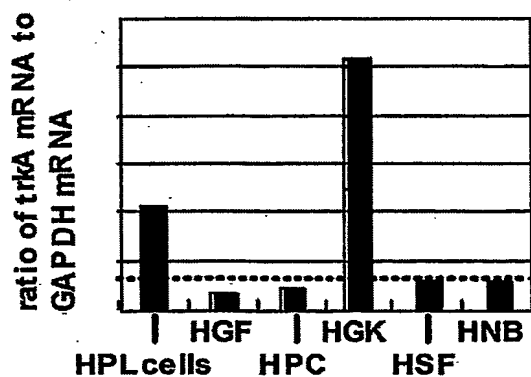
GAPDH



(B)

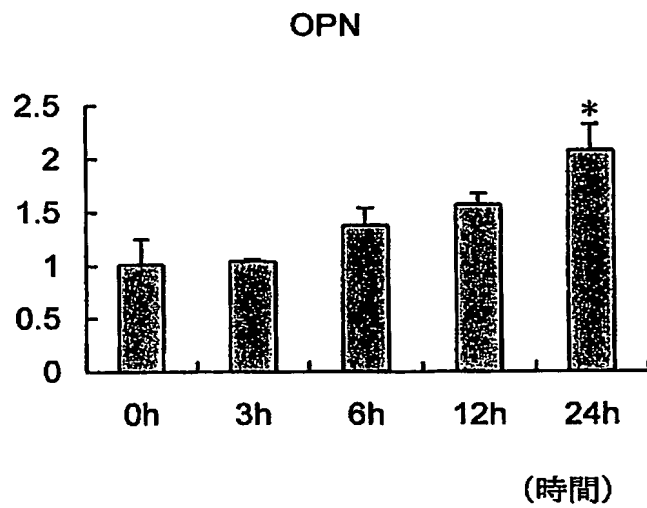
trkA

GAPDH

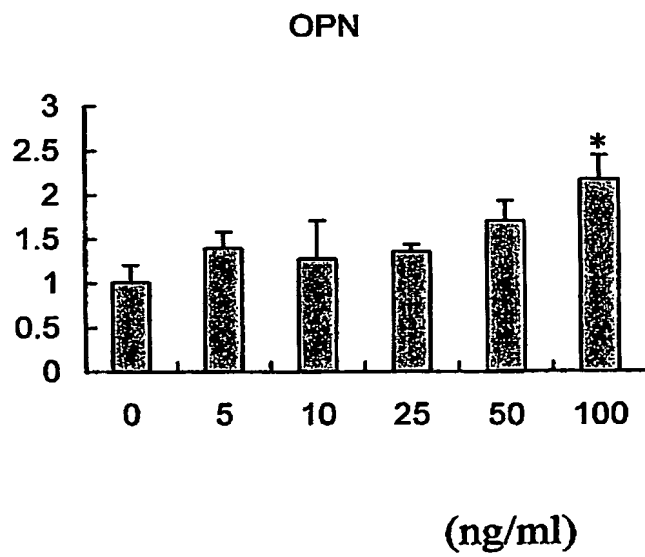


【図 12】

(A)

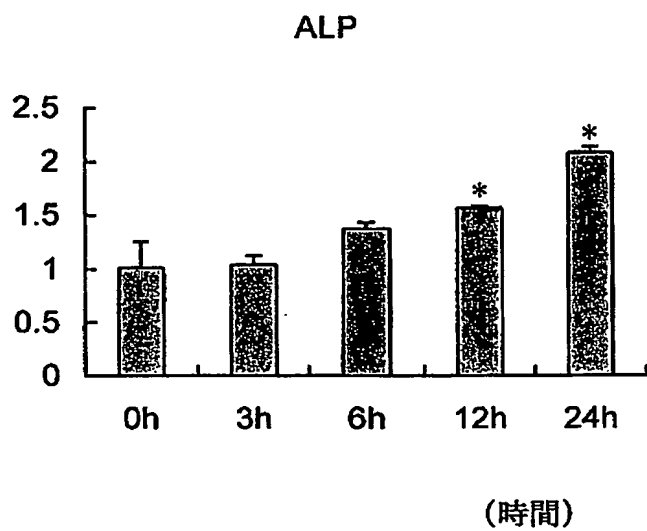


(B)

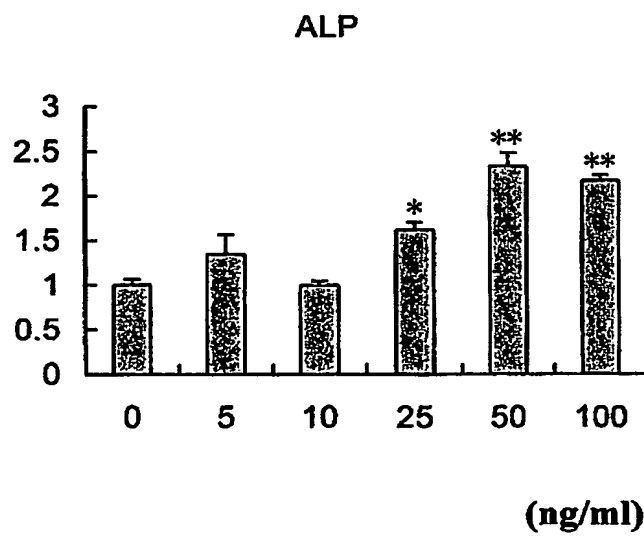


【図 13】

(A)

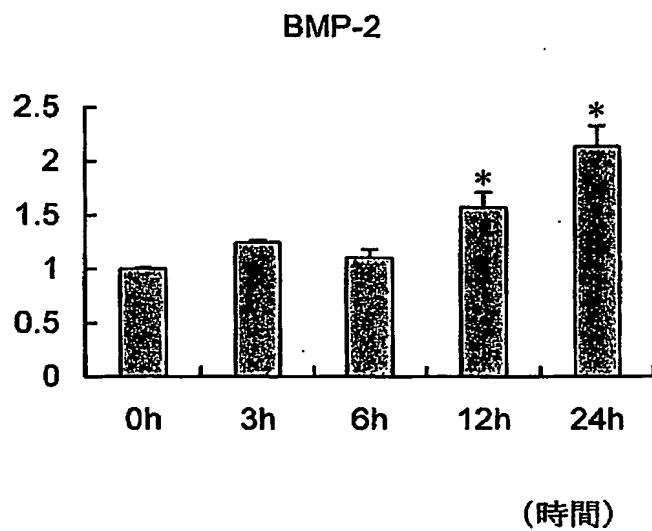


(B)

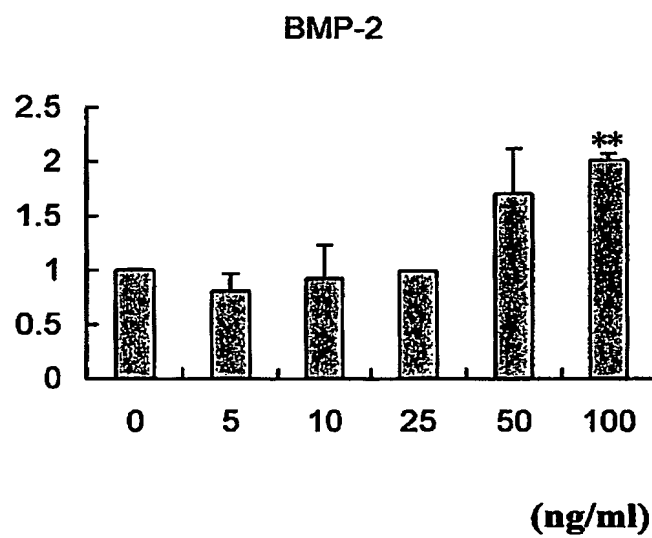


【図 14】

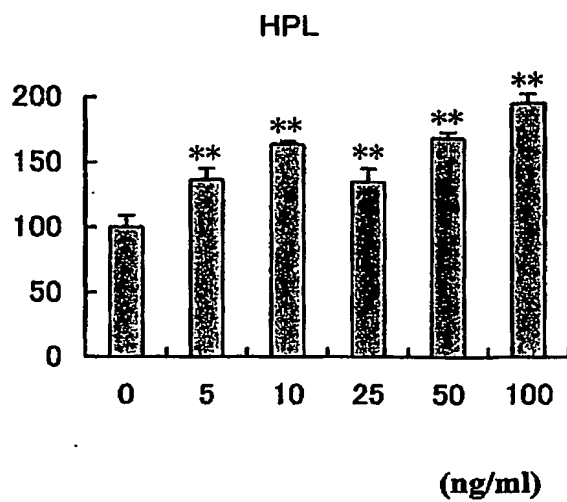
(A)



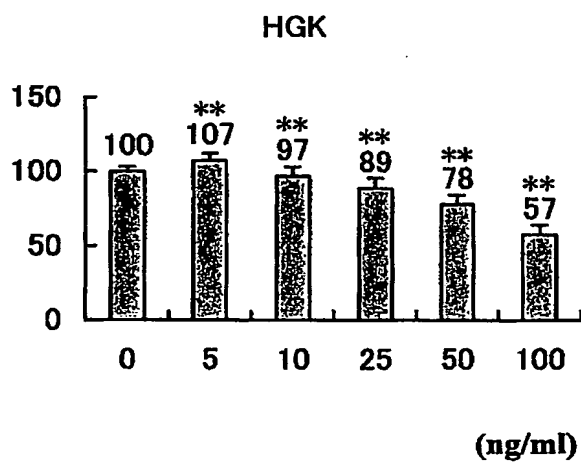
(B)



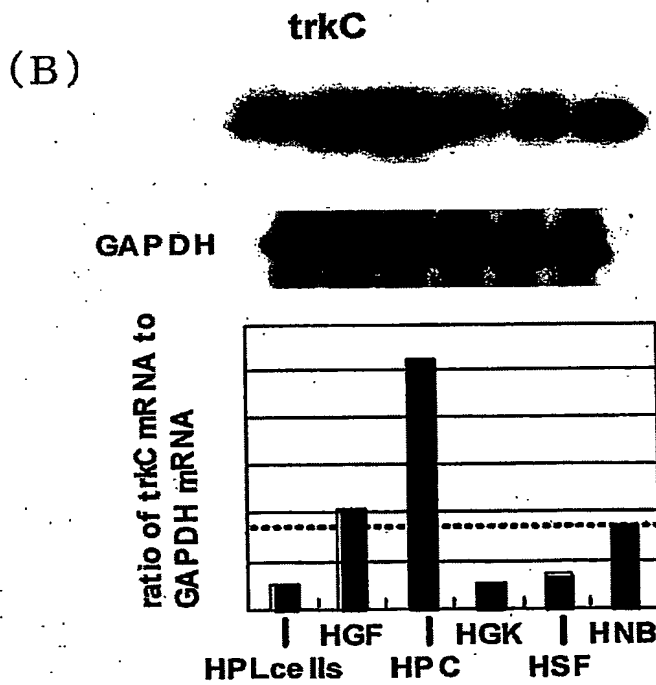
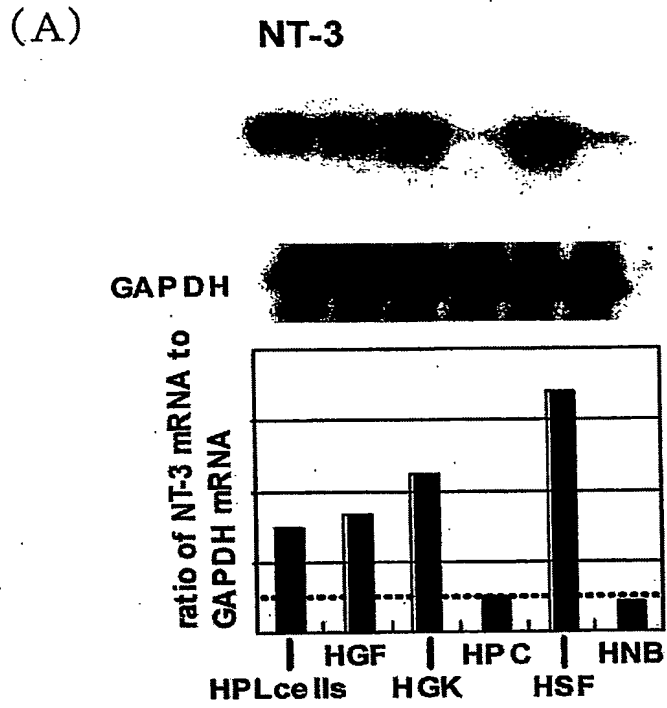
【図 15】
(A)



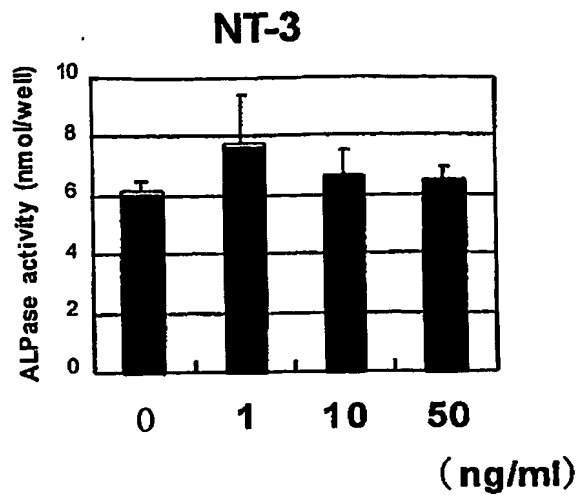
(B)



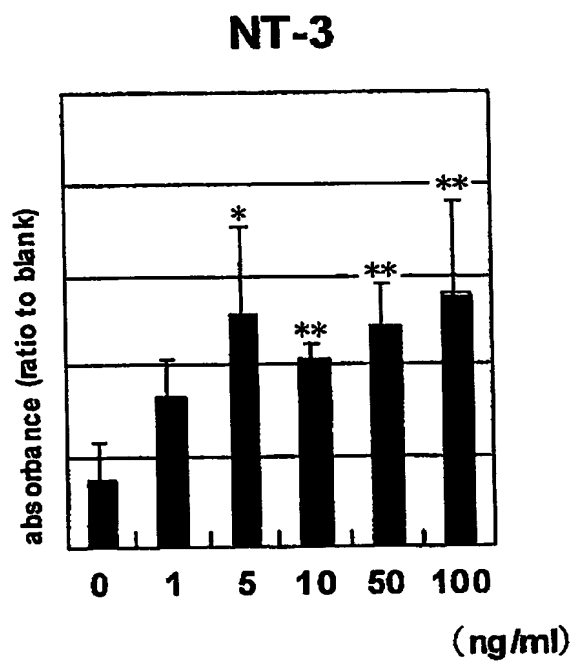
【図 16】



【図 17】



【図 18】



【書類名】 要約書

【要約】

神経栄養因子を有効成分とする、歯周病の治療剤。

【選択図】 なし

特願 2003-316719

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[503328193]

1. 変更年月日

2003年 9月 9日

[変更理由]

新規登録

住 所

広島県広島市南区段原四丁目5-17-501

氏 名

株式会社ツーセル

特願 2003-316719

出願人履歴情報

識別番号

[503328469]

1. 変更年月日

2003年 9月 9日

[変更理由]

新規登録

住 所

広島県広島市西区己斐東二丁目 27-31

氏 名

栗原 英見

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.